

JUSTYNA A. NOWAKOWSKA

Detekcja ekspresji genów drzew leśnych za pomocą mikromacierzy DNA

Gene-expression in forest-tree species assessed with microarrays as a tool

ABSTRACT

Nowakowska J. A. 2006. Detekcja ekspresji genów drzew leśnych za pomocą mikromacierzy DNA. Sylwan 4: 33-43.

DNA microarray technology is a powerful tool in functional genomics study of many organisms, the forest-trees included. This method allow to examine simultaneously the changes in expression of thousands of genes and it is based on specific hybridization of cDNA probes from an organism with the DNA library immobilized in an array. The power of this method consists in miniaturization, automation and parallel study of large-scale genome from multiple samples. In forest science, the microarray technology has already been applied in some study of gene-expression in *Populus*, *Pinus* and *Picea* species and the number of new reports is still increasing every year. Since far, some gene-expression have been studied among woody plants in regard of development and growth processes (xylem, adventitious-root and zygotic embryo formation, flowering, ripening, shooting of leaves), resistance mechanisms against biotic (fungi, viruses) and abiotic factors (drought, NaCl, elevated CO₂ and O₃ concentrations). Many practical applications of the microarray technique may concern the early selection in nursery of trees for morphologically valuable traits, the sustainable forest regeneration and the production of genetically transformed species for the chosen trait.

KEY WORDS

microarray, gene-expression, mRNA, ESTs, forest-tree species

ADDRESSES

Justyna A. Nowakowska – Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych; Instytut Badawczy Leśnictwa; ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3; 00-973 Warszawa; j.nowakowska@ibles.waw.pl

Wstęp

Zawarta w jądrze komórkowym informacja genetyczna w postaci łańcucha DNA gwarantuje przebieg podstawowych procesów biochemicznych oraz wytworzenie wszystkich cech morfologicznych organizmu. Ekspresja genów jest kluczowym procesem w przekazywaniu informacji genetycznej zawartej w DNA do cytoplazmy, gdzie następuje przełożenie (translacja) kodu genetycznego z mRNA na łańcuchy peptydowe (tabela, ryc. 1). Pojawienie się pewnej cechy fenotypowej w organizmie, np. wytworzenie odporności na niekorzystny czynnik biotyczny lub abiotyczny, zależy od poziomu i jakości białek syntetyzowanych na podstawie wytworzonych w jądrze komórkowym cząsteczek mRNA.

Od kilkudziesięciu lat badanie ekspresji genów na podstawie analizy RNA przyniosło wiele informacji odnośnie funkcji i aktywności wielu genów. Technika mikromacierzy powstała w wyniku udoskonalenia detekcji ekspresji genów wykonywanych takimi metodami, jak hybrydyzacja Northern blotting, ilościowa reakcja RT-PCR (czyli PCR z odwrotną transkrypcją), analiza zróżnicowanej amplifikacji (differential display) czy seryjna analiza ekspresji genów (SAGE). Jakkolwiek procedury te są nadal wykorzystywane w biologii molekularnej, szczegól-

Tabela 1.

Podstawowe terminy stosowane w genomice funkcjonalnej

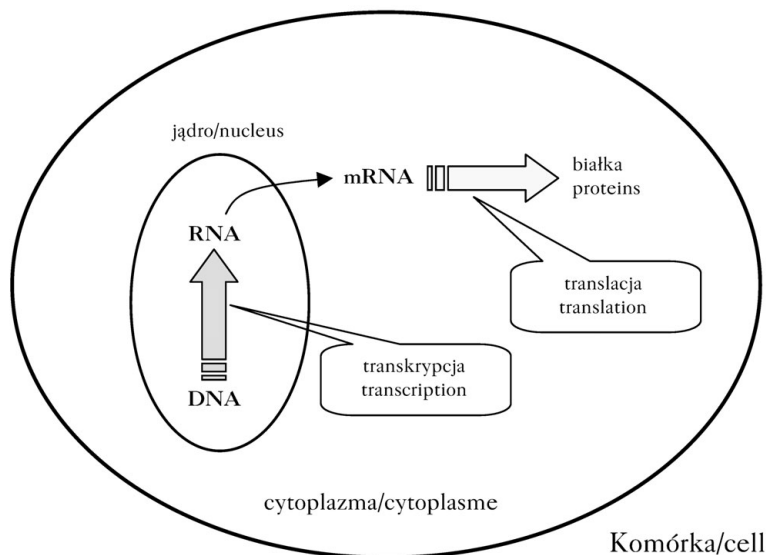
Glossary of functional genomics

Biblioteka DNA – zbiór genów danego organizmu	DNA library – the set of genes in one organism
BLAST – algorytm do wyszukiwania lokalnych podobieństw dwóch sekwencji DNA	BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
cDNA – komplementarne DNA, powstałe w wyniku odwrotnej transkrypcji mRNA	cDNA – complementary DNA, synthesized by reverse-transcriptase reaction
ekspresja genów – przeniesienie informacji genetycznej z DNA na mRNA	gene expression – mRNA synthesis from the DNA matrix
ESTs – zbiór sekwencji cDNA danego genu	ESTs – expressed-tagged-sites (cDNA of a given gene)
Genomika – badanie struktury genów na poziomie DNA	Genomics – study of gene structure at the DNA level
Genomika funkcjonalna – badanie struktury genów przez mikromacierze	Functional genomics – microarray analysis of gene-structure
Hybrydyzacja – przyłączanie komplementarnych cząsteczek kwasów nukleinowych	Hybridation – annealing of nucleic acid strains
Mikromacierze – płytki (szklane, nylonowe) zawierające dużą liczbę fragmentów genów danego organizmu, umożliwiają porównanie ekspresji genów w dwóch próbach jednocześnie – eksperymentalnej i kontrolnej,	Microarray – glass or nylon matrix containing the ESTs from a given organism
mRNA – informacyjne RNA (kwas rybonukleinowy), nośnik informacji między jądrem komórkowym a cytoplazmą	mRNA – messenger RNA (ribonucleic acid), a carrier of information between nucleus and cytoplasm
Sonda molekularna – fragment cDNA, który umożliwia detekcję danego genu	Molecular probe – cDNA fragment of a given gene
Transkrypcja – synteza RNA na podstawie informacji genetycznej w DNA-matrycy	Transcription – RNA synthesis from the DNA matrix
Translacja – synteza łańcuchów peptydowych na podstawie matrycy mRNA	Translation – protein synthesis from the mRNA

nie w przypadku analiz nieznanymi genów, są one często pracochłonne i mogą niekiedy generować fałszywe wyniki. Technika mikromacierzy (inaczej chipy DNA, mikroukłady DNA, mikrosiatki lub macierze DNA) omija wiele „wrażliwych” etapów wymienionych tutaj metod, dając w zamian równoczesną detekcję ekspresji tysięcy genów jednocześnie.

Po raz pierwszy technologię mikromacierzy opracowano w 1995 r. dla rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.) na Uniwersytecie w Stanford [Shena i in. 1995]. Ponieważ technika ta opiera się na poznaniu sekwencji genomu danego organizmu, jest ona z powodzeniem stosowana w badaniach ekspresji genów u organizmów o zsekwencjonowanym genomie, np. drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*), ryżu (*Oryza sativa*), kukurydzy (*Zea mays* L.), muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) i człowieka [Aharoni, Vorst 2001; Jin i in. 2001; Enard i in. 2002; Stamatoyannopoulos 2004]. W ostatnich latach opracowano również dużą liczbę sekwencji ESTs gatunków drzewiastych, np. *Populus*, *Citrus*, *Pinus* i *Picea*, co umożliwiło rozpoczęcie badań ekspresji genów przy zastosowaniu mikromacierzy [Hertzberg i in. 2001; Brinker i in. 2004; Stasolla i in. 2004; Forment i in. 2005].

Ogólnie, mikromacierze DNA polegają na detekcji ekspresji genów z danego organizmu poprzez hybrydyzację komplementarnych nici DNA – sond z kolekcją fragmentów genów



Ryc. 1.

Schemat procesu ekspresji genów w komórce, począwszy od syntezy cząsteczek RNA z matrycy DNA w jądrze komórkowym, po syntezę białek w cytoplazmie

Gene-expression process in the cell concerns the RNA synthesis from the DNA matrix in the nucleus and it ends by the protein synthesis in the cytoplasm

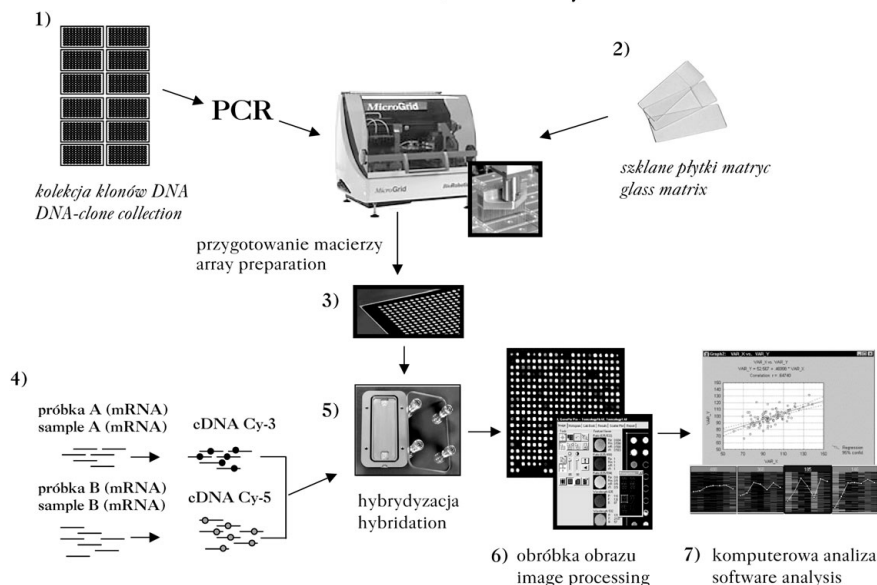
w postaci fragmentów DNA lub oligonukleotydów, przytwierdzonych do szklanych lub silikonowych płytek albo nylonowych podłoży, w ściśle określonym porządku [Freeman i in. 2000; Churchill 2002; Leung, Cavalieri 2003]. Detekcja poszczególnych genów odbywa się dzięki zastosowaniu fluorescencji o zmiennej długości fali dla próby doświadczalnej i kontrolnej (ryc. 1). Dzięki temu, w trakcie jednej analizy, możliwa jest detekcja tysięcy genów jednocześnie, głównie na zasadzie porównania poziomu ekspresji genów w obu próbach. Za pomocą mikromacierzy można identyfikować geny odgrywające ważną funkcję w procesach życiowych komórki (np. oddychanie, fotosynteza, transport komórkowy) oraz badać szlaki metaboliczne o nie poznany podłożu genetycznym.

Opis techniki mikromacierzy

Podstawową zasadą działania mikromacierzy DNA jest: 1) przygotowanie mikromacierzy 2) izolacja mRNA z analizowanych komórek i synteza sond znakowanych fluorescencyjnie, 3) hybrydyzacja sond z sekwencjami genów w macierzy, 4) detekcja obrazu przez wiązkę lasera, 5) analiza komputerowa genów o zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji (ryc. 2).

PRZYGOTOWANIE MIKROMACIERZY. Hybrydyzacja polega na przyłączeniu do podłoża – matrycy (są to najczęściej membrany nylonowe, szkiełka mikroskopowe i silikonowe lub ceramiczne „chipy”) specyficznych sekwencji genów, które pochodzą z analizowanych komórek. Jeśli genom danego organizmu nie został jeszcze zsekwencjonowany, do przygotowania macierzy wybierane są najbardziej reprezentatywne kolekcje ESTs z bibliotek genomowych, czyli fragmenty genów ulegających ekspresji w danym organizmie [Yang, Speed 2003]. Na ogół umieszcza się od 9000 do 30000 kopii ESTs w jednej płytce macierzy [Horvath i in. 2003; Forment i in. 2005]. Cała dalsza analiza detekcji ekspresji genów jest oparta na ilości i rodzaju

Mikromacierze/Microarrays



Ryc. 2.

Ogólny schemat techniki mikromacierzy. Objasnienia w tekście
 General scheme of microarray technique. Details in the text

genów (ESTs) umieszczonych na matrycy, gdyż stanowią one bazę danych dla wszystkich możliwych transkryptów. Przygotowanie klonów ESTs dla danego organizmu jest dość pracochłonne i w przypadku organizmów zbliżonych filogenetycznie można je zastąpić istniejącymi już sekwencjami ESTs, wyszukując je w ogólnej bazie danych (np. BLAST).

Mikromacierze można wykonać w laboratorium lub zakupić gotowe matryce. Lista ogólnie dostępnych mikromacierzy znajduje się m.in. na stronach www.api.com, www.gene-chips.com, www.wfubmc.edu/physpharm/gentech.

IZOLACJA mRNA Z KOMÓREK I SYNTEZA SOND ZNAKOWANYCH FLUORESCENCYJNIE. Dużą zaletą techniki mikromacierzy jest wymagana mała ilość wyjściowego materiału do analiz od 100 do 500 mg [Freeman i in. 2000]. Warto zaznaczyć, że mikromacierze umożliwiają analizę względnego poziomu ekspresji genów, który zawsze jest porównywany z inną próbą, kontrolną. Najczęściej porównuje się ekspresję genów w dwóch tkankach, jednej indukowanej np. czynnikiem zewnętrznym z drugą – tkanką kontrolną, nie poddaną indukcji (ryc. 2).

Następnie, wyizolowane mRNA, poddawane są odwrotnej transkrypcji w celu otrzymania sond cDNA. W mikromacierzach sondami mogą być: klony cDNA, produkty RT-PCR i oligonukleotydy [Churchill 2002]. Sekwencje sond utworzonych z klonów cDNA bardzo często generują niespecyficzne produkty hybrydyzacji, ponieważ wykazują niską homologię z poszukiwanymi genami. Ich zaletą jest jednak duża długość analizowanego fragmentu – nawet do kilkuset par zasad (pz). Sondy utworzone w wyniku reakcji odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) mają od 200 do 500 pz długości i wykazują większą specyficzność, gdyż pochodzą z regionów kodujących genomu. Sondy oligonukleotydowe powstają in situ, w trakcie hybrydyzacji fragmentów. Nie przekraczają one długości 80 pz, tak więc, aby zwiększyć moc detekcji danego genu, stosuje się wiele oligonukleotydów jednocześnie [Aharoni, Vorst 2001].

W dalszym etapie, sondy cDNA są znakowane w sposób bezpośredni lub pośredni, przez dołączanie fluorescencyjnych cząsteczek (np. cjanin Cy-3 i Cy-5) do syntetyzowanych nici cDNA w czasie reakcji RT-PCR. Reakcja RT-PCR bierze początek od oligonukleotydów startowych (dT)_n, które przyłączają się do końców 3'-mRNA i umożliwiają syntezę komplementarnego DNA dzięki retrowiralnemu enzymowi – odwrotnej transkryptazie. Znakowanie bezpośrednie polega na przyłączaniu cząsteczek fluoroforów bezpośrednio w trakcie syntetyzowanego łańcucha cDNA w reakcji RT-PCR, zaś metoda znakowania pośredniego polega na dołączeniu do cząsteczek cDNA dodatkowych grup estrowych, które zwiększają specyficzność przyłączenia fluoroforu do cDNA. Sondy oligonukleotydowe znakowane są tymi samymi markarami w dwóch próbkach, np. streptawidyną i biotyną [Dudda-Subramanya i in. 2003].

Ogólnie, w mikromacierzach opartych na sondach cDNA używane są dwa rodzaje fluorescencyjnych cjanin (zielona Cy-3 i czerwona Cy-5), dzięki czemu możliwe jest porównanie ekspresji dziesiątków tysięcy genów w dwóch rodzajach próbek jednocześnie.

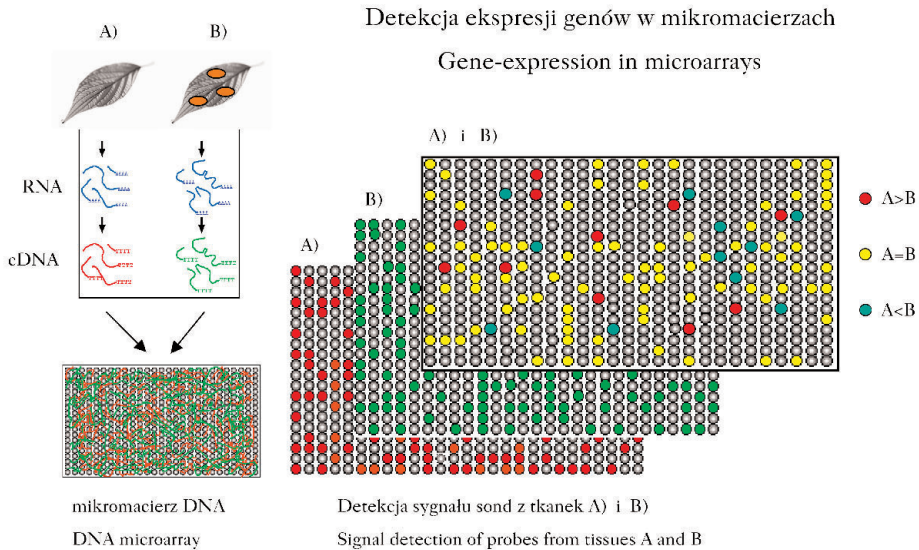
HYBRYDYZACJA SOND Z SEKWENCJAMI GENÓW W MACIERZY. Hybrydyzacja znakowanych sond z macierzą DNA jest kluczowym etapem techniki mikromacierzy i może być wykonywana ręcznie lub w specjalnym aparacie (np. Hyb4 Genomic Solutions), który zapewnia kontrolowane warunki temperatury i czasu hybrydyzacji. Dystrybucja sond cDNA do każdej ze studzienek macierzy jest losowa, aby w ten sposób zminimalizować błędną, niespecyficzną hybrydyzację i szum podłoża.

DETEKCJA OBRAZU. Detekcja obrazu za pomocą fluorescencji jest najczęściej używaną techniką w analizach mikromacierzy, macierzy oligonukleotydowych oraz mikroelektronicznych chipów. Badanie różnicowania siły sygnału między studzienkami mikromacierzy jest możliwe dzięki tzw. efektowi Stoke'a. Efekt ten polega na przesunięciu długości fali między wiązką wzbudzającą a wiązką emisji, co umożliwia analizę dwóch próbek (doświadczalnej i kontrolnej) dwoma fluoroforami jednocześnie. Na ogół fluorescencja jest odczytywana za pomocą mikroskopu konfokalnego, który generuje wzbudzające wiązki laserowe i przetwarza sygnał emisji na obraz komputerowy [Freeman i in. 2000].

Ponieważ poziom emisji sygnału rośnie liniowo, większa detekcja sygnału Cy-3 lub Cy-5 odpowiada względnie większej ekspresji danego genu w jednej próbce niż w drugiej. Jeśli np. cDNA z tkanki roślinnej poddanej suszy (próbka B) są znakowane zielonym fluoroforem Cy-3, a mRNA pochodzące z roślin kontrolnych (próbka A) – czerwonym Cy-5, to przewaga koloru zielonego w studzience mikromacierzy będzie świadczyła o zwiększonej ekspresji genów stresu wodnego w próbce B (ryc. 3). Kolor czerwony będzie oznaczał ekspresję genów w próbce A, nie poddanej działaniu suszy, zaś kolor żółty – zrównoważoną ekspresję obu rodzajów genów w komórce (A=B). Kolory pośrednie, między zielonym a czerwonym, są komputerowo analizowane w celu określenia przewagi ekspresji genu w jednej tkance nad drugą [Leung, Cavalieri 2003].

Im dany gen podlega większej ekspresji, tym więcej cząsteczek znakowanego cDNA przyłączy się do podłoża i emitowany sygnał będzie silniejszy.

KOMPUTEROWA ANALIZA DANYCH. Uzyskany obraz jest skanowany za pomocą np. GenePix 4000B (Axon Instruments) i analizowany w programie Acuity v 4.0. Ogólnie, analiza danych odbywa się po wstępnej eliminacji szumu podłoża w mikromacierzach (głównie przez pomiar próbek „zerowych”, czyli pozbawionych fragmentów DNA). Tak jak większość technik opartych na porównaniu poziomu ekspresji genów, w mikromacierzach dokonuje się wstępnie normalizacji warunków detekcji, poczynając od wyrównania liczby sond cDNA w każdej próbce, a kończąc na zminimalizowaniu sygnału ekspresji konstytutywnej genów. Interesujący przegląd



Ryc. 3.

Kod detekcji ekspresji genów w mikromacierzach DNA. Ekstrahowane RNA z próbki kontrolnej (A) i eksperymentalnej (B) są przekształcane w cząsteczki cDNA i znakowane fluorescencyjnie. Po hybrydyzacji sond cDNA z fragmentami genów w mikromacierzy, otrzymany obraz jest wynikiem założenia się dwóch kolorów emisji fluoroforu czerwonego z próbki A i zielonego z próbki B. Przewaga w mikromacierzy koloru czerwonego ($A > B$) świadczy o ekspresji genu z mikromacierzy w próbce A. Przewaga koloru zielonego ($A < B$) o ekspresji genu w próbce B. Kolor żółty, pośredni między kolorami sond A i B, występuje w przypadku równoczesnej ekspresji danego genu w próbce A i B ($A = B$).

Gene expression code in microarrays of DNA. First, the RNA are extracted from control (A) and experimental (B) samples. Then, the RNA are transformed into cDNA and labeled with fluorescent dyes. The image from hybridization of labeled probes with microarray containing different genes results in combination of two colors - red from probe A and green from the probe B. Red color displayed in microarray ($A > B$) proves the gene-expression in sample A in microarray. Green color intensity is characteristic for gene expression in sample B ($A < B$). The same level of yellow colored intensity ($A = B$) in microarray proves the equivalent gene expression in both samples, A and B

większości czynników wpływających na poziom odczytu ekspresji genów można znaleźć w pracy Freeman'a i in. [2000] oraz Aharoni, Vorst [2001].

Oprócz techniki mikromacierzy, istnieją również makromacierze DNA, które polegają na zautomatyzowanym przyłączeniu 200-5000 fragmentów DNA do membran, hybrydyzacji sond znakowanych radioaktywnymi izotopami i odczycie wyniku po naświetleniu klisz fotograficznych promieniami X. Zaletą makromacierzy jest wysoki stopień detekcji ekspresji genów przy zastosowaniu mniejszej liczby sond [Freeman i in. 2000].

Warto mieć na uwadze, że detekcja np. wysokiego poziomu ekspresji genów w próbce niekoniecznie odzwierciedla wysoki stopień syntezy aktywnych białek, do których powstania wymagane są inne złożone procesy biochemiczne w komórce. Aby zwiększyć wiarygodność analiz mikro- i makromacierzy stosuje się podstawowe kryteria badawcze, np. odpowiednią liczbę powtórzeń, porównywanie ekspresji genów w tkankach o zbliżonym stadium rozwoju, optymalizację hybrydyzacji przez randomizację, zastosowanie tej samej rezolucji obrazu w skanerze do analiz porównywalnych prób, itp. [Churchill 2002; Oleksiak i in. 2002; Yang, Speed 2003; Lelung, Cavalieri 2003]. Statystyczną obróbkę danych wykonuje się za pomocą ogólnie dostępnych programów, np. GEPAS v.1.1 (<http://gepas.bioinfo.ocha.fib.es/>), TM4

v. 3.1. (<http://www.tm4.org/>) i BASE (http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/education/classes/mgh_base_tutorial-dpark.htm).

Zastosowanie mikromacierzy w genetyce drzew leśnych

Ogólnie, praktyczne możliwości zastosowania danych na temat ekspresji genów za pomocą analiz mikromacierzy DNA są nieograniczone. Począwszy od analizy genów odpowiedzialnych za produkcję określonych substancji (np. substancji antyrakowych w przemyśle farmakologicznym), po przemysłowe zastosowanie w produkcji roślin o zwiększonej ekspresji genów kodujących korzystne cechy fenotypowe [Enard i in. 2002; Gibson 2002; Puruggan, Gibson 2003]. Metoda mikromacierzy jest wysoce wiarygodna i znajduje bardzo szerokie zastosowanie w genomice funkcjonalnej wielu organizmów, w tym również roślin drzewiastych.

Badania nad ekspresją genów u rośliny modelowej – *Arabidopsis thaliana*, zapoczątkowały rozwój genomiki funkcjonalnej u drzewiastych roślin uprawnych [Shena i in. 1995; Aharoni, Vorst 2001]. U *Arabidopsis* poznano jak dotąd szereg genów biorących udział np. w procesach wzrostu i rozwoju (m.in. biosyntezy lignin) oraz odporności na suszę, niskie wartości temperatury i zasolenie podłoża [Seki i in. 2002; Horvath i in. 2003; Ehling i in. 2005]. Dane te zostały wykorzystane w opracowaniu mikromacierzy DNA dla gatunków drzewiastych, o bardziej złożonym genomie.

Jako jedne z pierwszych, analizowano techniką mikromacierzy uprawne gatunki *Citrus*, w celu szybkiej detekcji aktywności genów w komórce w trakcie naturalnych procesów życiowych w roślinie (np. kwitnienia, dojrzewania owoców, zrzucania liści) lub pod wpływem działania czynników zewnętrznych (suszy, ataku patogenów, zasolenia podłoża). I tak, analiza ekspresji genów u *Citrus clementina* Hort., *C. macrophylla*, *C. medica* i *C. sinensis* wykazała ekspresję ok. 7000 genów biorących udział m.in. w procesach infekcji wirusowej przez szczep *Citrus tristeza* i *C. exocortis*, infekcji korzenie przez *Phytophthora citrophthora*, rozwoju liści, procesu kwitnienia, stresu wywołanego przez zasolenie podłoża NaCl [Forment i in. 2005]. Spośród zidentyfikowanych metodą mikromacierzy genów, podlegających ekspresji w badanych tkankach *Citrus clementina* Hort. ex Tan. cv. Clemenules, największą grupę stanowiły geny metabolizmu komórkowego (28,3%), geny cyklu komórkowego, replikacji i transkrypcji DNA (ok. 5%) oraz syntezy białek (3,9%). Inne geny, których ekspresja zwiększyła się pod wpływem badanych czynników to np. geny kodujące: białka odpornościowe (1,8%), białka transportu komórkowego (1,2%), białka biorące udział w przekazywaniu sygnałów w komórce (2,7%) i białka regulatorowe (0,7%) [Forment i in. 2005]. Spośród wszystkich wykrytych genów, 16% wykazało podobieństwo do genów kodujących białka u *Arabidopsis thaliana*, a 32% to geny kodujące białka o jeszcze nieznannej funkcji.

U *Populus tremula* × *P. alba*, *P. tremuloides* i *P. euramericana* badano metodą mikromacierzy ekspresję genów odpowiedzialnych za tworzenie włókien drewna reakcyjnego [Pilate i in. 2004]. W badaniach procesów komórkowych przejścia z fazy wzrostu do fazy spoczynku u *Populus tremula* odkryto zmniejszoną ekspresję genów w merystemie kambialnym kodujących m.in. białka z rodziny LEA, cytochromy P-450, dehydryny, ekstensyny; przy czym podstawowy poziom ekspresji genów np. ARF i Aux/IAA nie ulegał zmianie [Schrader i in. 2004]. W innym procesie rozwojowym u topoli, kwitnieniu *Populus trichocarpa*, badano aktywność genów podczas inicjacji tej fazy [Brunner, Nilsson 2004].

Aktywność genów kodujących metalotioniny oraz białka biorące udział w syntezie ściany komórkowej potwierdzono w przypadku ekspozycji liści topoli na podwyższone stężenie (560 ppm) CO₂ i 1,5× podwyższone ponad normę stężenie ozonu (O₃) oraz na atak wirusa plamistości mozaikowej topoli (PopMV) [Smith i in. 2004; Gupta i in. 2005; Taylor i in. 2005].

Jak dotąd, analizy mikromacierzy DNA u gatunków iglastych, zastosowano jedynie w badaniach niektórych gatunków sosny i świerka. Geny kodujące białka z rodziny arabino-galaktanów (ang. AGPs) oraz białka z rodziny glikoprotein bogatych w hydroksyproliny (HGRPs) ulegały zmniejszonej ekspresji w komórkach ksylemu podczas tworzenia drewna wczesnego i późnego u *Pinus taeda* [Yang i in. 2005]. Tworzenie się korzeni bocznych u *Pinus contorta* charakteryzuje się zmianą w profilu ekspresji ok. 220 genów, m.in. odpowiedzialnych za syntezę białek biorących udział w podziałach komórkowych, transportu auksyn, fotosyntezie, syntezie ściany komórkowej oraz genów białek stresowych i przekaźników informacji w komórce [Brinker i in. 2004].

U świerka (*Picea abies* L. Karst.) i sosny (*Pinus taeda*) badano mechanizmy regulacji rozwoju zarodków somatycznych podczas procesu embriogenezy. W tym celu porównano ekspresję 2178 ESTs w komórkach wytwarzających zarodki somatyczne z komórkami, w których *in vitro* zablokowano ten proces. Na podstawie badań mikromacierzy zidentyfikowano szereg genów odpowiedzialnych za przejście zarodków w poszczególne fazy rozwoju, tj. geny białek biorących udział w detoksykacji komórkowej, geny metionin i metabolizmu węglowodanów [Stasolla i in. 2004].

Technika mikromacierzy jest stosowana również w celu szybkiego poznania interakcji patogen – roślina na poziomie DNA, m.in. u drzew iglastych zaatakowanych przez korzeniowca wieloletniego (*Heterobasidion annosum*) i może być w przyszłości wykorzystana do transformacji genetycznej gatunków o zmniejszonej odporności [Asiegbu i in. 2005].

U *Pinus taeda* wykryto 131 różnic w ekspresji genów w zależności od geograficznego położenia badanych drzewostanów, co może świadczyć o genetycznym podłożu procesów adaptacyjnych w obrębie gatunku [Yang, Loopstra 2005]. Identyfikacja genów adaptacyjnych u gatunków drzewiastych oraz charakterystyka poszczególnych populacji pod kątem ekspresji genów warunkujących adaptację do zmiennych warunków środowiska może być podstawą do zachowania różnorodności biologicznej podczas sztucznych odnowień stanowisk leśnych.

Podsumowanie

Możliwości zastosowania wymienionych wyników w praktyce są bardzo duże, począwszy od analizy genów odpowiedzialnych za produkcję określonych substancji (przemysł farmakologiczny) po przemysłowe zastosowanie w produkcji roślin o zwiększonej ekspresji genów kodujących korzystne cechy fenotypowe.

Ogólnie, technika mikromacierzy DNA polega na:

- ✦ przygotowaniu mikromacierzy złożonych z sekwencji ESTs,
- ✦ izolacji mRNA z analizowanych komórek i syntezie sond znakowanych fluorescencyjnie,
- ✦ hybrydyzacji sond z sekwencjami genów w macierzy,
- ✦ detekcji obrazu przez wiązkę lasera,
- ✦ analizie komputerowej genów o zwiększonej, zmniejszonej lub stałej ekspresji.

W praktyce leśnej, mikromacierze mogą być wykorzystane w:

- ✦ szybkiej i precyzyjnej detekcji ekspresji tysiąca genów w próbce, począwszy od małej ilości materiału wyjściowego (od 100 do 500 mg),
- ✦ identyfikacji genów odgrywających ważną funkcję w procesach życiowych komórki (np. oddychanie, fotosynteza, transport komórkowy),
- ✦ badaniu szlaków metabolicznych o nieznanym podłożu genetycznym,
- ✦ identyfikacji genów odpowiedzialnych za cechy morfologiczne drzew (np. miąższość drewna),

- ✦ identyfikacji genów odpowiedzialnych za cechy rozwojowe (tj. proces kwitnienia, wytwarzania korzeni bocznych, wykształcania owoców, nasion itp.),
- ✦ identyfikacji genów odpowiedzialnych za cechy odpornościowe na czynniki biotyczne (patogeny bakteryjne, grzybowe i szkodliwe owady) i czynniki abiotyczne (zasolenie podłoża, susza, niekorzystne warunki środowiska itp.).
- ✦ wczesnej selekcji drzew wykazujących korzystne cechy fenotypowe,
- ✦ poznaniu interakcji patogen – roślina na poziomie ekspresji genów,
- ✦ transformacji genetycznej gatunków w celu nadania odporności lub cennych cech fenotypowych,
- ✦ zachowaniu różnorodności biologicznej w trakcie odnowień stanowisk leśnych.

Literatura

- Aharoni A., Vorst O. 2001. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol. Biol.* 48: 99-118.
- Asiegbu F. O., Adomas A., Stenlid J. 2005. Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. l. *Molecular Plant Pathology* 6(4): 395-409.
- Brinker M., van Zyl L., Liu W., Craig D., Sederoff R. R., Clapham D. H., von Arnold S. 2004. Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*. *Plant Physiology* 135: 1526-1539.
- Brunner A. M., Nilsson O. 2004. Revisiting tree maturation and floral initiation in poplar functional genomics era. *New Phytologist* 164: 43-51.
- Churchill G. A. 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature genetics suppl.* 32: 490-494.
- Dudda-Subramanya R., Lucchese G., Kanduc D., Sinha A. A. 2003. Clinical applications of DNA microarray analysis. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 3: 297-304.
- Ehrling J., Mattheus N., Aeschliman D. S., Hamberg B., Cullis I. F., Zhuang J., Kaneda M., Masfield S. D., Samuels L., Ritland K., Ellis B. E., Bohlmann J., Douglas C. J. 2005. Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *The Plant Journal* 42: 618-640.
- Enard W., Khaitovich P., Klose J., Zöllner S., Heissig F., Giavalisco P., Nieselt-Struwe K., Muchmore E., Varki A., Ravid R., Doxiadis G. M., Bontrop R. E., Pääbo S. 2002. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* 296: 340-343.
- Forment J., Gadea J., Huerta L., Abizanda L., Agustí J., Alamar S., Alos E., Andreas F., Arribas R., Beltran J. P., Berbel A., Blazquez M. A., Brumos J., Canas L. A., Cercos M., Colmenero-Flores J. M., Conesa A., Estabes B., Gandia M., Garcia-Martinez J. L., Guerri J., Lafuente M. A., Madueno F., Marcos J. F., Marques M. C., Martinez F., Martinez-Godoy M. A., Miralles S., Moreno P., Navarro L., Pallas V., Perez-Amador M. A., Perez-Valle J., Pons C., Rodrigo I., Rodriguez P. L., Royo C., Vicente O., Vidal Ch., Zacarias L., Conejero V. 2005. Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* 57: 375-391.
- Freeman W. M., Robertson D. J., Vrana K. E. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 29: 1042-1055.
- Gibson G. 2002. Microarray in ecology and evolution: a preview. *Molecular Ecology* 11: 17-24.
- Gupta P., Duplessis S., White H., Karnosky D. F., Martin F., Podila G. K. 2005. Gene expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO₂ and tropospheric O₃. *New Phytologist* 167: 129-142.
- Hertzberg M., Sievertzon M., Aspeborg H., Nilsson P., Sandberg G., Lundeberg J. 2001. cDNA microarray analysis of a small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocol. *The Plant Journal* 25 (5): 585-591.
- Horvath D. P., Schaffer R., West M., Wisman E. 2003. *Arabidopsis* microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species. *The Plant Journal* 34: 125-134.
- Jin W., Riley R. M., Wolfinger R. D., White K. P., Passador-Gurgel G., Gibson G. 2001. The contribution of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics* 29: 389-395.
- Leung Y. F., Cavalieri D. 2003. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends in Genetics* 19(11): 649-659.
- Oleksiak M. F., Churchill G. A., Crawford D. L. 2002. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature genetics* 32: 261-343.
- Pilate G., Déjardin A., Laurans F., Lepié J.-C. 2004. Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytologist* 164: 63-72.
- Puruggan M., Gibson G. 2003. Merging ecology, molecular evolution, and functional genetics. *Molecular Ecology* 12: 1109-1112.

- Schrader J., Moyle R., Bhalerao R., Hertzberg M., Lundeberg J., Nilsson P., Bhalerao R. P. 2004. Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. *The Plant Journal* 40: 173-187.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. 2002. *The Plant Journal* 31(3): 278-292.
- Shena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Smith C. M., Rodriguez-Buey M., Karlsson J., Campbell M. M. 2004. The response of the poplar transcriptome to wounding and subsequent infection by a viral pathogen. *New Phytologist* 164: 123-136.
- Stamatoyannopoulos J. A. 2004. The genomic gene expression. *Genomics* 84: 449-457.
- Stasolla C., Bozhkov P. V., Chu T.-M., van Zyl L., Egertdotter U., Suarez M. F., Craig D., Wolfinger R. D., von Arnold S., Sederoff R. R. 2004. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiology* 24: 1073-1085.
- Taylor G., Street N. R., Tricker P. J., Sjödin A., Graham L., Skogström O., Calfapietra C., Scarascia-Mugnozza G., Jansson S. 2005. The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytologist* 167: 143-154.
- Yang S.-H., Loopstra C. A. 2005. Seasonal variation in gene expression for loblolly pines (*Pinus taeda*) from different geographical regions. *Tree Physiology* 25: 1063-1073.
- Yang S.-H., Wang H., Sathyan P., Stasolla C., Loopstra C. A. 2005. Real-time RT-PCR analysis of loblolly pine (*Pinus taeda*) arabinogalactan-protein and arabinogalactan-protein-like genes. *Physiologia Plantarum* 124: 91-106.
- Yang Y. H., Speed T. 2003. Part 1: Design of microarray expression experiments. In: *DNA microarray. A molecular cloning manual*. David Bowtell and Joseph Sambrook. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 2003.

SUMMARY

Gene-expression in forest-tree species assessed with microarrays as a tool

Microarray technique is a powerful approach for genomics research. In the field of functional genomic, microarray-based analysis enables the determination of alleles at hundreds of thousands of loci from numerous samples. This method consists in 5 main steps of experimental design. First, the microarrays with the ESTs library of genes are prepared. The arrays are based on different solid matrix: the glass microscope slides and silicon/ceramic chips or nylon membranes. In second step, the samples to analyze are prepared. Generally, two kinds of material are tested: one treated or examined for a specific trait and the other as a reference (or control). Then, the mRNA are extracted from each sample and transformed into cDNA labeled with different fluorescent dyes (e.g. Cy-3 and Cy-5). In the third step, the cDNA probes are hybridized with the microarray and the resulting image of fluorescence is analyzed. The latest step consists in computer processing of the generated data. The power of this method consists in miniaturization, automation and parallel study of large-scale genome from multiple samples.

Since far, several genes have been discovered in *Citrus* species i.e. *Citrus clementina* Hort., *C. macrophylla*, *C. medica* i *C. sinensis*. These genes are involved in many cell processes including cell metabolism, cell cycle, DNA processing, transcription, protein synthesis, cellular transport, signal transduction, cell rescue, defense mechanisms, energy production and interactions with environment. In *Populus*, *Pinus* and *Picea species* the microarray technique has been mainly used in order to study the development and growth processes (xylem, adventitious root and zygotic embryo formation, flowering, ripening, shooting of leaves), resistance mechanisms against biotic (fungi, viruses) and abiotic factors (drought, NaCl, elevated CO₂ and O₃ concentrations).

The application in forest-tree genetics may be considered in many fields, e.g.:

- ✦ fast and precise detection of the gene-expression from little amount of plant material required (100-500 mg),

- ✦ identification of genes involved in crucial processes of cell live (respiration, photosynthesis, transport),
- ✦ study of metabolic pathways with unknown genetic background,
- ✦ identification of genes coding morphological traits (e.g. timber quality),
- ✦ identification of genes coding developmental traits involving e.g. flowering, adventitious root, fruit and seed formation,
- ✦ identification of genes coding proteins involved in plant resistance against biotic factors (bacteria, fungi pathogens and insects), and abiotic factors (salt, drought, unfavourable environmental conditions),
- ✦ early selection in nursery of trees with morphologically valuable traits,
- ✦ identification of genetic background concerning the pathogen – plant interaction,
- ✦ genetic transformation of woody plants in order to enhance the resistance or to produce the valuable morphological trait,
- ✦ biodiversity conservation while artificial regeneration of forest tree stands is planned.